

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOLOGIA APPLICATA E FISIOPATOLOGIA

Ciclo XXII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: MED/18

TITOLO TESI

***“Sviluppo di un modello sperimentale di
insufficienza epatica acuta post- ischemica
nel suino”***

Presentata da: Dott. Vincenzo Pacilè

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Carlo Franzini

Prof. Bruno Nardo

Esame finale anno 2010

INTRODUZIONE

L'insufficienza epatica acuta (IEA) è una sindrome che si accompagna ad un'altissima mortalità, pari a circa l'80 - 90% dei casi. La causa patogenetica più frequente è rappresentata dall'epatite virale, seguono le reazioni idiosincrasiche a farmaci (anestetici, FANS, antimicrobici) e le forme dovute ad agenti tossici (funghi, piante velenose, prodotti industriali). Cause più rare sono rappresentate dalle alterazioni biochimiche congenite (morbo di Wilson) o acquisite (sindrome di Reye), da anomalie vascolari, dall'insufficienza epatica acuta in corso di gravidanza e dalle forme post-traumatiche (1).

Nonostante il trattamento di questi malati nei reparti di terapia intensiva ed il crescente utilizzo di sistemi di supporto epatico extracorporeo quali il Bio Artificial Liver (BAL) o il Molecular Absorbent Recycle System (MARS) abbiano migliorato i risultati in termini di mortalità, solo il trapianto epatico ortotopico (OLT) ed il trapianto epatico eterotopico ausiliario (ELTaux) sono in grado di garantire una sopravvivenza fra il 50 ed il 70% (2) (3).

MANIFESTAZIONI CLINICHE DELL' IEA

Nonostante la storia naturale dell'IEA sia estremamente variabile, lo sviluppo relativamente comune di complicanze cardiovascolari, neurologiche, polmonari e renali segna l'inizio di una cascata di eventi che hanno come momento culminante l'instaurarsi di una sindrome da insufficienza multiorgano (MOF) (4)(5). L'edema cerebrale, i difetti della funzione reticoloendoteliale, le ulcere da stress del tratto gastrointestinale e la pancreatite acuta sono ulteriori manifestazioni della sindrome. La mortalità appare direttamente correlata al numero di organi compromessi ed alla durata della loro disfunzione (6) (7).

La IEA presenta severe alterazioni circolatorie caratterizzate da una bassa resistenza vascolare sistemica ed un aumentata attività cardiaca compensatoria (8) (9).

Lo scompenso cardiaco e l'ipotensione che ne deriva, associato all'instaurarsi di un quadro di edema cerebrale rappresentano la principale causa di morte dei pazienti affetti da IEA (10).

Le complicanze a livello dell'apparato respiratorio sono estremamente frequenti (75-90%) e sono di varia eziologia e gravità. Le più frequenti sono rappresentate dalle infezioni, quali tracheo-bronchiti e polmoniti che possono essere provocate da diversi fattori quali l'ipoventilazione secondaria a coma, l'insorgenza di edema polmonare e cause iatrogene (pneumotorace, emotorace) (11).

L'ipovolemia, la vasocostrizione renale, l'ipotensione, la vasodilatazione arteriolare prolungata ed i farmaci, in prevalenza nefrotossici, somministrati in pazienti affetti da IEA, rappresentano i principali fattori che determinano l'instaurarsi di una insufficienza renale acuta (12).

Infine, fra gli innumerevoli meccanismi che influenzano la patogenesi della IEA, lo sviluppo dell'ipossia tessutale epatica porta alla necrosi parenchimale nonostante l'assenza di segni clinici e biochimici (13).

Negli ultimi 40 anni dai molti studi dedicati all'IEA è scaturita la necessità di mettere a punto dei modelli sperimentali in grado di riprodurre i pattern clinici, biochimici ed istologici dell'IEA nell'uomo.

Tuttavia ad oggi non è stato descritto un modello sufficientemente valido e riproducibile di IEA nell'animale, poiché ogni modello focalizza un aspetto particolare dell'insufficienza e non la totalità della sindrome.

Inoltre, la storia naturale ed il comportamento dei farmaci e dei modelli chirurgici non è sovrapponibile all'insufficienza epatica di origine virale nell'uomo.

La risposta delle varie specie animali alle epatotossine ed all'intervento chirurgico hanno limitato la scelta dei modelli; per un lungo periodo di tempo sono stati utilizzati modelli che prevedevano l'impiego di animali di piccola taglia che non hanno dato risultati soddisfacenti.

Il trapianto ortotopico (OLT) rappresenta allo stato attuale il gold standard nel trattamento dei pazienti affetti da IEA; tale procedura è dettata dalla impossibilità di recuperare il fegato nativo.

Il paziente viene così esposto ai rischi generali connessi ad un OLT in particolare modo al rigetto ed agli effetti connessi alla terapia immunosoppressiva.

Ci si pone dunque la necessità di ricercare dunque una valida alternativa all'OLT in grado di recuperare il fegato nativo, dopo la sua completa rigenerazione (14).

Al fine di migliorare i risultati di questa procedura nasce la necessità di identificare un modello sperimentale di IEA, che oltre ad essere valido e riproducibile, sia anche reversibile, e consenta quindi l'instaurarsi dei processi di rigenerazione del fegato nativo.

REQUISITI PER UN MODELLO ANIMALE

Particolare interesse riveste in letteratura il lavoro di Terblanche & Hickman (1991) (15) nel quale vengono individuati e proposti i requisiti fondamentali a cui devono rispondere i modelli sperimentali :

1. REVERSIBILITÀ

Secondo gli Autori un trattamento adeguato nel modello animale di IEA deve poter essere reversibile, di conseguenza permettere la sopravvivenza della cavia. Attualmente la maggior parte degli studi che impiegano meccanismi di supporto epatico hanno mostrato solo il miglioramento di alcuni parametri specifici, come quelli biochimici o neurologici, senza offrire nessun sensibile vantaggio in termini di sopravvivenza.

2. RIPRODUCIBILITÀ

I diversi modelli sperimentali devono, al fine di poter effettuare indagini statistiche, essere standardizzati.

3. MORTE PER INSUFFICIENZA EPATICA

La successione degli eventi dopo l'insulto epatico dovrebbe riflettere il pattern clinico umano, la morte dovrebbe essere una conseguenza diretta dell'insulto.

4. FINESTRA TERAPEUTICA

Il modello sperimentale deve prevedere un intervallo temporaneo, compreso tra l'insulto e la morte della cavia, in cui è possibile intervenire con il potenziale trattamento terapeutico.

5. MODELLI DI ANIMALI DI GRANDE TAGLIA

L'utilizzo di animali di grande taglia permette la raccolta di campioni seriati di sangue e tessuti durante il trattamento.

6. MINIMO RISCHIO PER IL PERSONALE

Le manovre che vengono praticate durante l'attuazione degli esperimenti, insieme ai supporti tecnici ed agli agenti chimici utilizzati, devono essere di basso rischio per il manipolatore ed il personale addetto.

MODELLI SPERIMENTALI

La creazione di modelli sperimentali di epatite fulminante si basa su tre differenti approcci: chirurgico, farmacologico o con altre procedure. Il primo comprende le resezioni epatiche e la devascolarizzazione del fegato, il secondo la somministrazione di epatotossine quali il paracetamolo, la D-galattosammina ecc. Il rimanente gruppo comprende tutti quei metodi che utilizzano agenti infettivi e che generalmente non hanno avuto successo e possono risultare pericolosi per il manipolatore (16).

MODELLI CHIRURGICI

I modelli chirurgici vengono suddivisi in tre gruppi: epatectomie parziali, epatectomie totali e devascolarizzazioni parziali o complete del fegato.

A) EPATECTOMIE PARZIALI

Come descritto in letteratura in seguito a epatectomia parziale che include fino al 70% del parenchima si ha una rigenerazione completa e quasi il 100% di sopravvivenza dell'animale (17) (18). Secondo uno studio pubblicato da Panis et al. (19) nei ratti una resezione parenchimale superiore all'80% ha indotto un'insufficienza epatica acuta associata ad una aumentata mortalità. Resezioni estese

fino al 75% erano correlate al 100% di sopravvivenza a 48 ore, resezioni più ampie dell'85% del parenchima portavano una percentuale di sopravvivenza del 18% ed infine resezioni fino al 90% del parenchima erano correlate ad una mortalità del 100%.

L'alterazione dello stato fisiologico che determina l'aumento della mortalità sembra essere conseguente all'aumento del flusso ematico portale totale nel parenchima epatico residuo (20) (21). Questo aumento del flusso portale per unità tessutale induce lesioni con danno delle cellule endoteliali sinusoidali portando all'attivazione delle cellule del Kupffer ed al rilascio di citochine con il conseguente instaurarsi della IEA (22).

L'aumento delle transaminasi avviene tardivamente tra le 12-24 ore così come l'ipoglicemia, che solitamente si manifesta in fase preterminale; inoltre l'aumento del flusso portale determina un aumento delle endotossine ematiche provenienti dell'intestino (23).

Tutti questi eventi sono comuni a qualsiasi tipo di animale di laboratorio utilizzato (ratti, conigli, maiali, ecc.) e sono riproducibili in quanto alla mortalità ma non riproducono i pattern clinici dell'IEA nell'uomo (profilo biochimico, ipoglicemia...) oltre a non essere, nella maggior parte dei casi, reversibili (24)(25)(26).

B) EPATECTOMIE TOTALI

I modelli "anepatici" consistono nella rimozione totale del fegato. Originariamente si pensava che questo potesse rappresentare un modello di insufficienza epatica acuta in quanto dopo una epatectomia totale sarebbero state assenti le peculiari funzioni sintetiche e metaboliche. In realtà, le attuali conoscenze dell'insufficienza epatica acuta ci dimostrano quanto sia importante,

nello sviluppo della patogenesi, la risposta infiammatoria del fegato necrotico in situ (27).

Di fatto, questo modello non riflette un aspetto importante della sindrome, in quanto l'epatectomia totale viene a volte eseguita in pazienti in attesa di trapianto per migliorare, con l'eliminazione dell'organo necrotico, il quadro clinico (28)(29)(30).

In definitiva, questo modello presenta diversi inconvenienti: l'irreversibilità, a meno che non si esegua un trapianto epatico (31); il coma epatico è breve se paragonato a quello umano; l'assenza della tossiemia legato al fegato necrotico ed infine la comparsa di alterazioni biochimiche da 2 a 4 ore prima dell'exitus (32).

C) DEVASCOLARIZZAZIONE PARZIALE O COMPLETA

I meccanismi lesivi che si instaurano in seguito alla devascolarizzazione sono molto complessi ed includono per esempio la lesione da riperfusione (33).

La devascolarizzazione parziale comporta la necessità di confezionare uno shunt porto-cava e di effettuare un successivo clampaggio temporaneo dell'arteria epatica (31). In letteratura sono descritti modelli che prevedono clampaggi che vanno dai 30 minuti alle 6 ore (34)(35).

La devascolarizzazione totale viene effettuata mediante la legatura dell'arteria epatica e lo shunt porto-cava (36), pertanto, questo modello, è simile all'epatectomia totale in quanto non ha correlazioni con la sindrome clinica, essendo irreversibile.

MODELLI FARMACOLOGICI

Le epatotossine sono state ampiamente utilizzate nello studio di modelli animali di insufficienza epatica acuta; in particolare, sono state utilizzate la D-Galattosamina (D-Gal), l'acetaminofene (paracetamolo / APAP), il tetracloruro di carbonio (CCl₄), la tioacetamide (TAA) e recentemente la Concanavalina A (Con A) e il lipopolisaccaride (LPS).

A) D-GALATTOSAMINA

È un aminoglucide che viene metabolizzato nel fegato provocando il blocco della trascrizione epatica con diminuzione della sintesi proteica associata a endotossiemia portale (37).

Sono state descritte risposte diverse secondo il tipo di cavia utilizzata, per esempio, i ratti sono sensibili mentre i topi sono resistenti anche ad alte dosi (38).

Se ne deduce che la differente risposta delle specie, l'alto costo e il rischio potenziale del personale limitano l'utilizzo in modelli animali di grande taglia (39)(40).

B) ACETOMINOFENE

Nel Regno Unito l'avvelenamento con paracetamolo è la causa più frequente di IEA (41).

In condizioni normali il metabolismo dell'APAP avviene nel fegato dove viene metabolizzato ed eliminato attraverso i reni. In condizioni di sovradosaggio si saturano queste vie e l'APAP viene metabolizzato dal citocromo P-450 con la formazione di metaboliti tossici (42).

Anche in questo caso è stata dimostrata una differente risposta in funzione della specie e dell'età, in rapporto alla presenza ed all'efficacia del citocromo P-450 (43)(44).

In modelli animali non risulta utile in quanto presenta scarsa riproducibilità, imprevedibilità degli effetti dose-risposta e variabilità dei tempi dell' exitus. Ricordiamo inoltre che all'effetto epatotossico si aggiunge l'effetto nefrotossico, cardiottossico e il danno polmonare (45)(46).

C) TETRACLORURO DI CARBONIO

Gli effetti tossici da CCl₄ sono conosciuti da diverso tempo; anche in questo caso il meccanismo di azione coinvolge il citocromo P-450 nella produzione di metaboliti attivi. Il CCl₄ è stato ampiamente usato negli anni 70-80 per indurre IEA in modelli animali ma la scarsa riproducibilità e le differenze dei quadri clinici (lieve encefalopatia, coma epatico tardivo) insieme alla variabilità fra le specie non lo rendono un modello affidabile (47)(48).

D) TIOACETAMIDE

Il TAA causa necrosi epatocellulare in seguito alla biotrasformazione nel metabolita attivo (TAA-S-ossido) (49). Il limite principale di questa molecola è rappresentato dalla sua importante variabilità fra le differenti specie.

E) CONCAVALINA A

È una lecitina derivata dai semi delle piante di fagioli che agisce come un mitogeno per la stimolazione dei linfociti T portando al rilascio ed alla espressione delle citochine. Studi fatti con l'utilizzo di questa lecitina hanno evidenziato come limite principale il costo eccessivo della tossina ed il riscontro di risultati differenti nel danno epatico (50).

F) LIPOPOLISACCARIDE

È un componente della parete cellulare dei Gram-negativi che attivando le cellule del Kupffer provoca danno epatico (51)(52). La somministrazione simultanea di basse dosi di LPS ed altre epatotossine (D-Gal, allotano, alcool, ecc.) è stata utilizzata per potenziare il danno epatico (53)(54).

Le alterazioni biochimiche e metaboliche provocate appaiono in genere tempestivamente, fra le 2-6 ore, per tanto questo modello è utilizzato per studiare solo alcuni aspetti specifici dell'IEA senza però riprodurre la sindrome.

MODELLO SPERIMENTALE PERSONALE

Il modello sperimentale, da noi messo a punto, consiste in una tecnica originale di devascolarizzazione selettiva (DS) dell'80% del parenchima epatico mentre il parenchima residuo viene sottoposto a stress ischemico variabile da 45 a 60 minuti che condizionerà

l'instaurarsi di un quadro di IEA in grado di portare ad exitus la cavia rispecchiando i patterns clinici , bioumorali ed anatomicopatologici dell'IEA nel uomo.

SEDE

Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona

Unidad de Cirugía HBP y Trasplante Hepático

MATERIALE E METODI

23 Maiali ibridi di 35-40 kg, femmine, stabulati in condizioni conformi alla normativa DARP della Generalitat de Catalunya ; a digiuno da 24h permettendo l'accesso all'acqua *ad libitum*.

ANESTESIA

-Premedicazione:

Azaperona im, 15 min. prima dell'induzione 5mg/kg.

Atropina 0.5-1mg im

-Induzione:

Tiopental Sodico ev 2-7mg/kg attraverso una vena auricolare.

Miorilassante (Bromuro di Pancuronio) ev 0.1 mg/kg

-Intubazione

endotracheale:

Ventilazione con respiratore volumetrico con FiO₂ al 100%

Mantenimento dell'anestesia con Fentanil ev 1,25 microgr/kg e Tiopental sodico ev 3-5mgr/kg, dosi ripetibili ogni 45 min.

Soluzione Glucosata al 10%

-Monitorizzazione emodinamica:

- ECG posizionamento elettrodi
- PA cateterizzazione arteria carotidea destra
- PVC cateterizzazione vena giugulare destra

Durata dell'intervento circa 2 ore, monitoraggio continua fino all'exitus per insufficienza emodinamica severa non correggibile (2-9 ore).

VIE DI ACCESSO VENOSO ED ARTERIOSO

Dissezione cervicale destra con incannulamento dell'arteria carotide e della vena giugulare come vie per il monitoraggio invasivo dei parametri vitali della cavia.

PROTOCOLLO CHIRURGICO

Il fegato del maiale si divide anatomicamente in cinque lobi principali che a differenza dell'uomo sono ben demarcati: lobo laterale sinistro (31 %), lobo mediale sinistro (23,5 %), lobo anteriore destro (25,5 %), lobo posteriore destro e lobo caudato (20%). Ognuno di questi lobi viene irrorato da un ramo portale ed uno arterioso, ad eccezione del caudato le cui cellule circondano la vena cava e ricevono una vascolarizzazione diretta (Fig. 1, 2).

Sono stati realizzati quattro gruppi:

- A. Clampaggio totale (arterioso e portale) con shunt porto-cava temporaneo.
- B1. Clampaggio selettivo di 45 min. del lobo posteriore destro senza shunt porto-cava.
- B2. Clampaggio selettivo di 60 min. del lobo posteriore destro senza shunt porto-cava.

C. Devascolarizzazione selettiva senza clampaggio del lobo PD, gruppo controllo.

| | Group A | Group B1 | Group B2 | Group C |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| Cavie | n.6 | n.8 | n.5 | n.4 |
| Shunt PC | SI | NO | NO | NO |
| Stress ischemico lobo PD | 60 min. | 45 min. | 60 min. | 0 min. |

La prima fase dell'intervento é comune a tutti i gruppi. Attraverso una laparotomia mediana xifo-pubica si esplora la cavità addominale per rilevare eventuali anomalie, si incide quindi il peritoneo dell'ilo epatico identificando la via biliare principale e successivamente l'arteria epatica comune proseguendo la dissezione fino al tronco celiaco. Si procede quindi alla dissezione della vena porta fino alla confluenza con la vena splenica, a questo punto viene dissecata, lungo tutto il suo tragitto, l'arteria epatica comune identificando, senza lesionarlo, il ramo destro da cui origina un piccolo ramo per il lobo posteriore destro (PD); quest'ultimo di fatto, sarà l'unica arteria che rimarrà pervia dopo la devascolarizzazione ed il clampaggio (Fig. 3). Si continuerà a dissecare l'arteria epatica fino ad identificare i suoi rami medio e sinistro e l'arteria coronaria. A questo punto si procederà in maniera differente nei vari gruppi(Fig 4,5).

GRUPPO A

Si procede alla sclerotizzazione della vena porta sino alla sua biforcazione; si identifica e si isola il ramo portale per il lobo PD il quale viene repertato sul versante laterale Dx della vena porta in prossimità della sua biforcazione (Fig.6,7). Successivamente si confeziona uno shunt porto-cava latero-laterale in modo da deviare il flusso portale ed evitare la stasi ematica a livello splancnico nelle fasi che prevedono il clampaggio della vena porta.

Si procede all'induzione dello stress ischemico, della durata di 60 minuti, mediante clampaggio dell'arteria epatica Dx, legatura dell'arteria epatica Sn e clampaggio della vena porta a monte dello shunt ed a valle del ramo portale per il lobo PD. Si procederà alla riperfusione selettiva del lobo PD mediante declampaggio portale e chiusura dello shunt porto-cava; la porta verrà successivamente legata in prossimità della sua biforcazione a monte dell'origine del ramo portale per il lobo PD (Fig 8,9). Il ripristino della perfusione arteriosa del lobo PD si otterrà mediante la legatura dell'arteria epatica Dx subito a monte dell'emergenza del ramo per il lobo PD.

GRUPPO B1-B2

Negli animali appartenenti a questo gruppo è prevista una esclusione vascolare del lobo PD, per 45 o 60 minuti, mediante clampaggio selettivo del ramo portale per il lobo PD, la legatura dell'arteria epatica Sn ed il clampaggio dell'arteria epatica Dx (Fig.10,11). Una volta ottenuto lo stress ischemico, si procederà alla riperfusione del lobo PD mediante il declampaggio del ramo portale per il lobo PD e dell'arteria epatica DX; seguirà la devascolarizzazione del restante fegato mediante legatura della porta in prossimità della sua biforcazione ed a monte dell'emergenza del suo ramo per il lobo PD cui seguirà la legatura dell'arteria epatica destra a monte dell'emergenza del suo ramo per il lobo PD.

Nei gruppi A, B1 e B2 sono state monitorate durante la fase di riperfusione le variazioni cromatiche del parenchima epatico, una ripresa del colore bruno rossastro si è osservata a livello del lobo PD mentre la porzione di fegato devascolarizzato assumerà un colore nerastro ed una consistenza flaccida, infine si procede alla chiusura della parete.

GRUPPO C

Negli animali che sono stati assegnati a questo gruppo è stata effettuata la devascolarizzazione selettiva del fegato ad eccezione del lobo PD come descritto nei gruppi B1 e B2.

In questo gruppo non è stato praticato nessuno stress ischemico del lobo PD.

CONTROLLO E MANTENIMENTO DELL'ANIMALE

Sono stati eseguiti valutazioni e controlli di tipo:

- a. biochimico
- b. emodinamico
- c. istologico

a. Gli esami di laboratorio, eseguiti all'inizio ed alla fine dell'intervento chirurgico ed ogni 90 minuti fino all'exitus, sono stati i seguenti:

Bilirubina tot., GOT, GPT, GGT, Fosfatasi Alcalina, Tempo di Quick, Glicemia ed Emogasanalisi.

b. I controlli emodinamici sono stati eseguiti a livello regionale mediante la determinazione del flusso portale con flussimetro (Transonic T206) all'inizio dell'intervento chirurgico e dopo la legatura dei rami portalì; a livello sistemico attraverso la determinazione della Frequenza Cardiaca, della Pressione Arteriosa e della Pressione Venosa Centrale.

c. L'esame istologico è stato effettuato mediante biopsia del segmento posteriore destro.

Il monitoraggio clinico-analitico dell'animale anestetizzato è stato mantenuto fino alla sua morte per instabilità emodinamica severa non correggibile con farmaci.

RISULTATI

- Storia clinica e sopravvivenza

Gruppo A: tutti i 6 maiali sono morti in un tempo medio di 330 min. con un range compreso tra i 125 ed i 390 minuti; nell'autopsie eseguite su tutti i maiali appartenenti a questo gruppo non sono stati evidenziati raccolte ematiche intraperitoneali ad eccezione di un maiale che è deceduto dopo 125 min.

Gruppo B1: gli 8 maiali hanno presentato un periodo di sopravvivenza media maggiore rispetto al gruppo A, la mortalità si è verificata in un tempo medio di 490 min. con un range compreso tra i 410 ed i 550 min. Nelle autopsie eseguite su tutti i maiali non si sono riscontrate segni di sanguinamento intraperitoneale.

Gruppo B2: ha presentato una mortalità insorta in un tempo medio di 160 min. con un range compreso tra i 115 ed i 190; nelle autopsie eseguite sui 5 maiali appartenenti a questo gruppo è stato evidenziato in due casi la presenza di raccolte ematiche intraperitoneali.

Nei 4 animali appartenenti al gruppo C di controllo si è registrato, nei primi due giorni di osservazione, la comparsa di sintomi gastrointestinali come vomito e diarrea, nei giorni successivi invece si è assistito ad un miglioramento delle condizioni cliniche. A 5 giorni dalla procedura gli animali sono stati sacrificati ed in tutti si è

osservato una ipertrofia del lobo PD ; nessun segno di raccolta ematica intraperitoneale è stato rilevato.

- Risultati indagini bioumorali

Gli esami biochimici eseguiti sugli animali dei diversi gruppi hanno messo in evidenza delle rapide modificazioni degli indici di funzionalità epatica che rendono evidente l'instaurarsi, in un tempo molto breve, del quadro clinico della IEA.

In tutti i gruppi si è assistito ad una diminuzione graduale del tempo di Quick. (Ist. 1)

In tutti i gruppi abbiamo osservato un incremento delle GOT e delle GPT, tali dati sono stati più significativi negli animali appartenenti al gruppo A. (Ist.2, 3)

L'incremento della Lattico deidrogenasi si è registrato in forma graduale in tutti i modelli. (Ist. 4)

Un incremento della Fosfatasi Alcalina è stata osservata in tutti i gruppi; negli animali appartenenti al gruppo B2 questo parametro si è modificato più precocemente. (Ist. 5)

Nel gruppo C si sono evidenziate iniziali significative variazioni degli indici di funzionalità epatica con una tendenza al loro decremento ed alla normalizzazione a partire dalla terza giornata dall'esecuzione della procedura.

| Group A | Basal | Postop | 2h | 4h |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| TP sec | 14.2 | 18.2 | 21.1 | 22.2 |
| TQ % | 92 | 73 | 57 | 46 |
| TTPAsec | 19.5 | 24.2 | 35.4 | 29.1 |
| BTmg/dl | 0.16 | 0.27 | 0.60 | 0.69 |
| BDmg/dl | 0.15 | 0.18 | 0.37 | 0.39 |
| GOT UI/L | 37 | 140 | 250 | 2900 |
| GPT UI/L | 33 | 39 | 58 | 124 |
| GGT UI/L | 38 | 52 | 87 | 95 |
| FA UI/L | 87 | 170 | 412 | 515 |
| LDH UI/L | 1310 | 1365 | 2312 | 3441 |
| PH | 7.41 | 7.34 | 7.09 | 7.00 |

Tabella riassuntiva indagini bioumorali gruppo A

| Group B1 | Basal | Postop | 2h | 4h | 6h | 8h |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| TPsec | 12.9 | 14.1 | 14.6 | 15.9 | 17.7 | 24.4 |
| TQ% | 105 | 94 | 90 | 75 | 68 | 38 |
| TTPAsec | 16.9 | 17.5 | 20.7 | 21.6 | 24 | 32 |
| BTmg/dl | 0.24 | 0.30 | 0.61 | 0.7 | 0.91 | 1.35 |
| BDmg/dl | 0.15 | 0.19 | 0.30 | 0.48 | 0.54 | 0.96 |
| GOT UI/L | 37 | 68 | 121 | 1252 | 2060 | 3100 |
| GPT UI/L | 22 | 26 | 29 | 59 | 83 | 91 |
| GGT UI/L | 51 | 61 | 80 | 97 | 98 | 105 |
| FA UI/L | 155 | 234 | 284 | 370 | 436 | 502 |
| LDH UI/L | 994 | 1061 | 1141 | 3167 | 5297 | 5652 |
| PH | 7.48 | 7.43 | 7.41 | 7.23 | 7.20 | 7.05 |

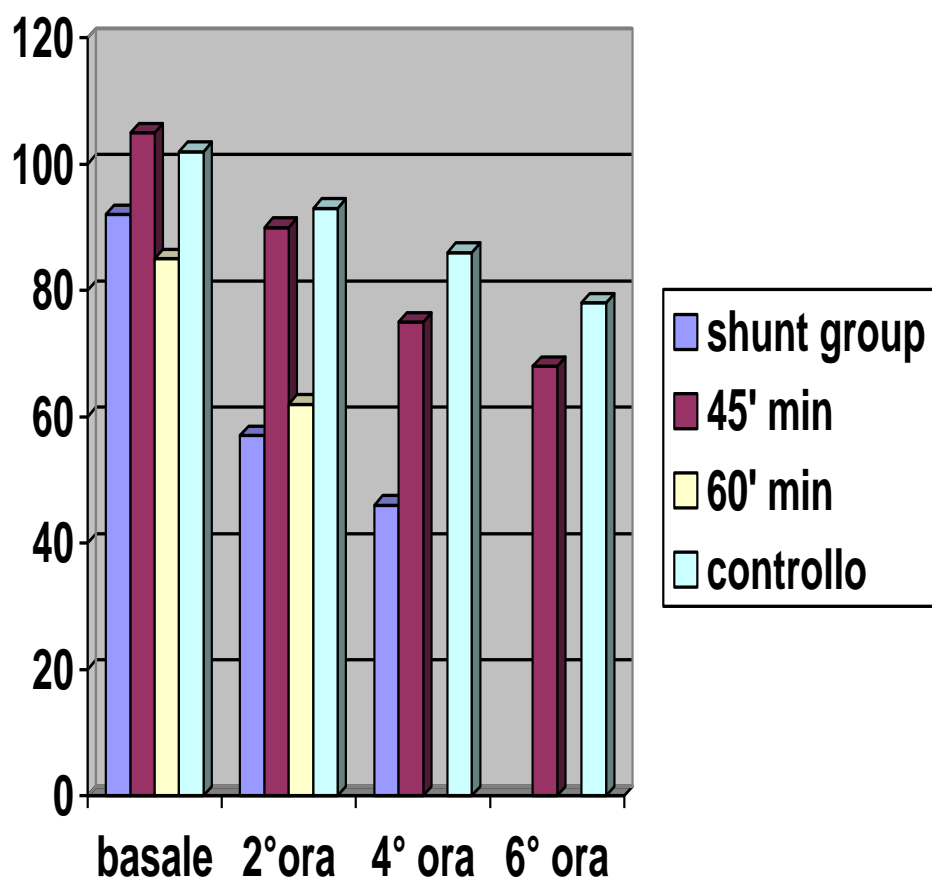
Tabella riassuntiva indagini bioumorali gruppo B1

| B2 | Basal | Postop | 2h |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|
| TP sec | 15.4 | 16.9 | 23.1 |
| TQ% | 85 | 76 | 62 |
| TTPA sec | 18 | 20.5 | 21.9 |
| BTmg/dl | 0.21 | 0.52 | 1.09 |
| BDmg/dl | 0.15 | 0.31 | 0.64 |
| GOT UI/L | 37 | 79 | 161 |
| GPT UI/L | 18 | 21 | 25 |
| GGT UI/L | 35 | 42 | 74 |
| FA UI/L | 146 | 430 | 869 |
| LDH UI/L | 861 | 960 | 1268 |
| PH | 7.5 | 7.41 | 7.39 |

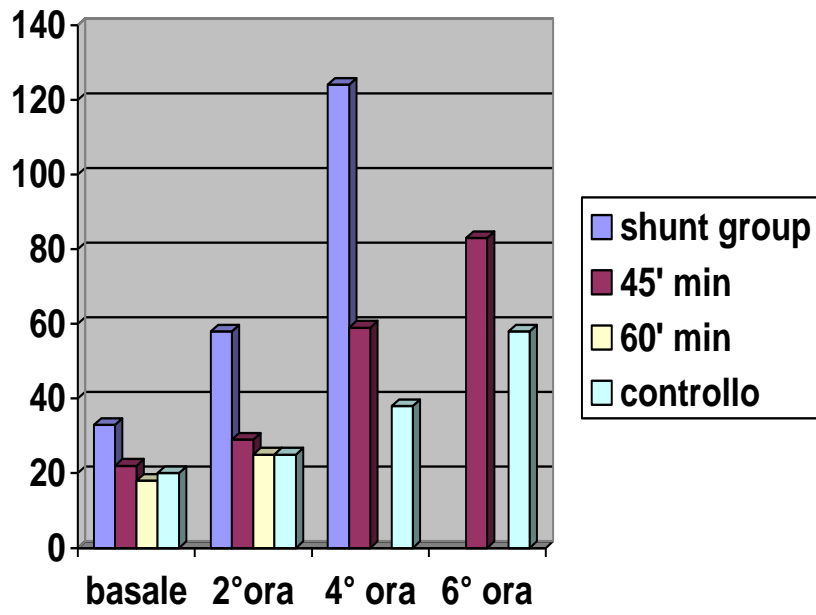
Tabella riassuntiva indagini bioumorali gruppo B2

| Group C | Basa 1 | Post | 2h | 4h | 6h | 1g | 2g | 3g | 4g | 5g |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| TP | 13.2 | 13.8 | 14.4 | 15.2 | 16.6 | 17.5 | 18.5 | 15.3 | 15.2 | 15.1 |
| TQ % | 102 | 97 | 93 | 86 | 78 | 69 | 60 | 86 | 85 | 85 |
| TTPA | 23.1 | 24.1 | 26.7 | 32.9 | 32.5 | 33.6 | 24.2 | 22.8 | 22.7 | 22.7 |
| BT | 0.24 | 0.44 | 0.88 | 0.92 | 1.06 | 3.96 | 5.00 | 3.26 | 3.33 | 2.32 |
| BD | 0.15 | 0.26 | 0.46 | 0.45 | 0.56 | 2.00 | 2.06 | 1.21 | 1.60 | 1.27 |
| GOT | 21 | 112 | 348 | 892 | 1572 | 5785 | 2495 | 1201 | 663 | 283 |
| GPT | 20 | 21 | 25 | 38 | 58 | 408 | 213 | 132 | 99 | 29 |
| GGT | 23 | 35 | 37 | 45 | 35 | 37 | 42 | 39 | 37 | 33 |
| FA | 159 | 178 | 212 | 228 | 283 | 695 | 529 | 329 | 261 | 138 |
| LDH | 916 | 1064 | 1528 | 2494 | 3522 | 11453 | 9615 | 8353 | 7564 | 3755 |
| PH | 7.55 | 7.53 | 7.51 | 7.48 | 7.46 | 7.53 | 7.53 | 7.52 | 7.52 | 7.52 |

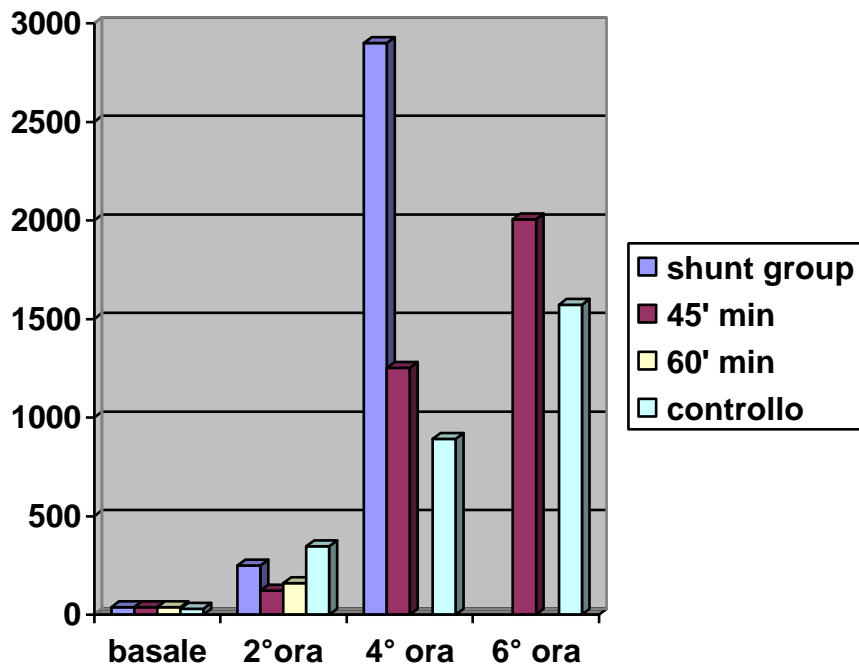
Tabella riassuntiva indagini bioumorali gruppo C



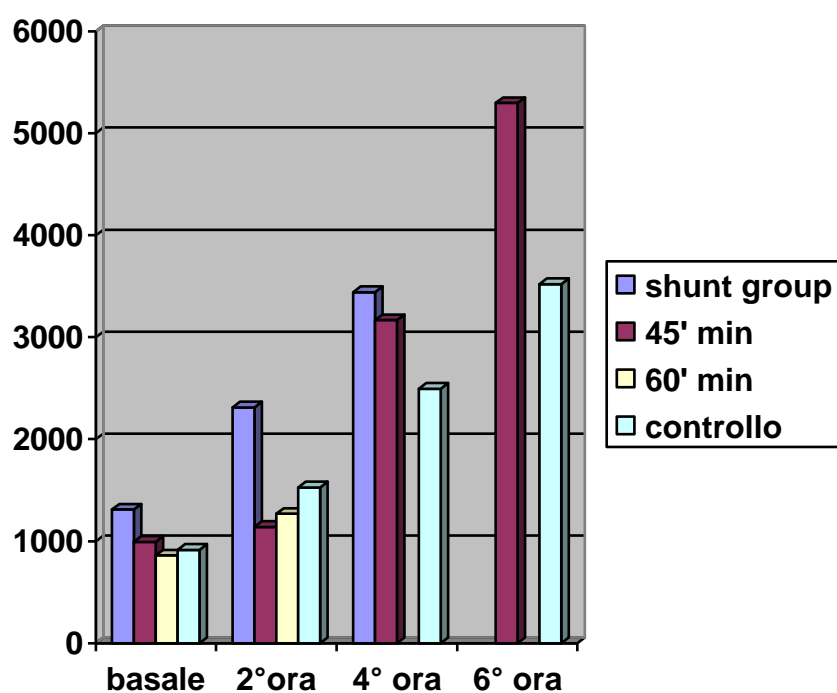
Istogramma 1: Tempo di Quick



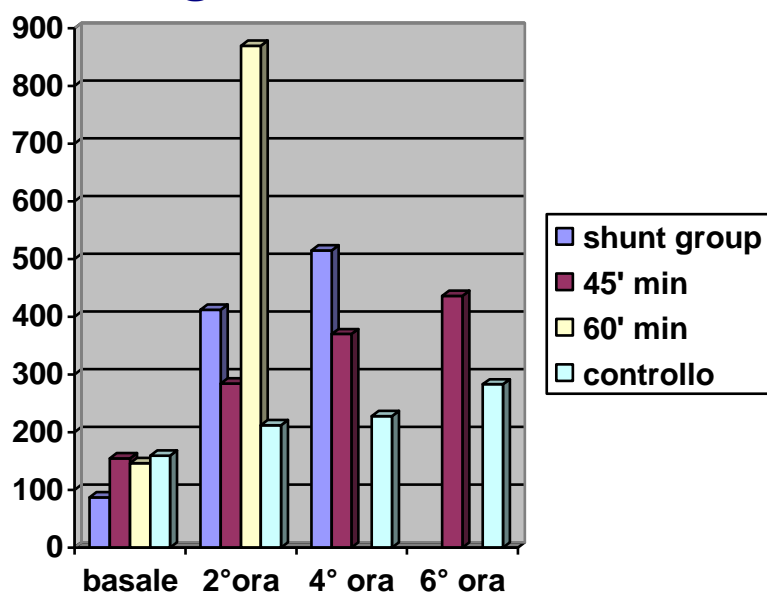
Istogramma 2: GOT



Istogramma 3: GPT



Istogramma 4: LDH



Istogramma 5: Fosfatasi Alcalina

- Risultati esami istologici

Negli esami istologici eseguiti su tutti gli animali appartenenti ai gruppi A, B1 e B2 al momento dell' exitus si è evidenziata la presenza di una severa necrosi centrolobulare con la concomitante presenza di infiltrati di linfociti neutrofili; inoltre si è osservata la presenza di vacuolizzazioni negli epatociti periportal.

DISCUSSIONE

Clinicamente la IEA è caratterizzata da una relazione temporale dall'instaurarsi dell'ittero alla successiva comparsa dell'encefalopatia.

La combinazione dei segni clinici e delle alterazioni biochimiche rispecchiano la perdita della capacità del fegato a svolgere le sue peculiari attività di sintesi, metabolica, immunologica e detossificante.

L'IEA porta gradualmente, in un arco di tempo più o meno, breve all'instaurarsi di una insufficienza cardiovascolare, respiratoria e renale. L'aumento della pressione endocranica cui segue l'edema cerebrale insorge più tardivamente e rappresenta la principale causa di morte nei pazienti affetti da IEA a meno che non vengano sottoposti ad un trapianto di fegato.

Istologicamente l'IEA è rappresentata dall'insorgenza di una massiva necrosi epatica.

Mentre si conoscono le conseguenze relative all'instaurarsi di una IEA i meccanismi che la determinano non sono del tutto conosciuti.

Di grande importanza è l'ausilio della chirurgia sperimentale al fine di identificare i diversi modelli di IEA e studiarne le peculiari caratteristiche la cui conoscenza può offrire spunti per diverse alternative terapeutiche.

Negli ultimi 40 anni molti sono stati i modelli di IEA descritti in letteratura in animali di piccola e grande taglia ma nonostante tutto “non esiste il modello perfetto” vista la variabilità clinica dell'IEA sia nell'uomo che negli animali. Studi recenti evidenziano non solo una differenza razziale ma anche un polimorfismo genetico individuale. Tutti i modelli animali presentano dei problemi e nessuno soddisfa totalmente i criteri proposti da Terblanche. I modelli che utilizzano Concanavalina A e LPS, per esempio, non riflettono i pattern clinici della patologia nell'uomo ma, comunque sono stati utili nello studio dei meccanismi cellulari che coinvolgono la malattia autoimmune epatica e nel caso del LPS nello studio della sepsi. L'utilizzo dell'APAP ha mostrato la più stretta somiglianza in termini di parametri temporali, clinici, biochimici e patologici; i suoi effetti sono comunque difficilmente riproducibili, in quanto richiedono un'induzione enzimatica per la trasformazione nel suo metabolita attivo, frequenti monitoraggi dei tassi circolanti per prevenire la metaemoglobinemia ed infine ha mostrato tossicità per gli altri organi.

D-Gal riproduce alcuni cambiamenti biochimici, metabolici e fisiopatologici simili a quelli della IEA; la scarsa riproducibilità e il costo eccessivo ne limitano l'utilizzo in animali di grande taglia.

Anche l'utilizzo del CCl₄ è diminuito negli ultimi anni per la variabilità nelle specie e la scarsa riproducibilità.

Nel protocollo di ricerca da noi messo a punto si è stabilito di studiare un modello sperimentale di IEA che potesse essere reversibile con un trapianto ausiliare, per studiare quest'ultimo come alternativa terapeutica all'OLT. Abbiamo quindi escluso tutti i modelli farmacologici per i motivi sopra descritti e anche perché in previsione di un trapianto ausiliare volevamo evitare l'utilizzo di altri farmaci che avrebbero aggiunto ulteriori variabili al modello.

La devascolarizzazione totale e l'epatectomia totale sono state escluse perché evidentemente non reversibili, mentre, l'epatectomia parziale, risulta essere metodica operatore dipendente gravata da alta morbilità.

Il nostro protocollo sperimentale è stato dettato dalla necessità di avere un modello in cui era possibile instaurare un quadro di IEA in un arco di tempo relativamente breve in cui la mortalità, in previsione di un ELTaux, non sopraggiungesse troppo rapidamente.

Dalla accurata valutazione dei risultati ottenuti nei diversi gruppi abbiamo identificato dei fattori che rendono il gruppo in cui è stato praticato uno stress ischemico della durata di 45 minuti (Gruppo B1) il più valido al nostro scopo. Infatti questo gruppo di animali ha presentato una sopravvivenza media superiore ai gruppi A e B2 in quanto la mortalità delle cavie è stata registrata in un tempo medio di 490 minuti con un range compreso tra i 410 ed i 550 min.

Il gruppo di animali in cui è stato effettuato lo shunt porto-cava ed il successivo clampaggio arterioso e portale, ha evidenziato come limite principale la necessità di praticare sulle strutture dell'ilo epatico un eccesso di manovre oltre che una difficoltà tecnica legata al confezionamento dello shunt; a questi aspetti tecnici si deve aggiungere la eccessiva variabilità della mortalità che è sopraggiunta in un tempo medio di 330 min. con un range compreso tra 125 e 390 minuti.

Nei due gruppi in cui è stato praticato il clampaggio selettivo degli elementi vascolari per il lobo PD con l'effettuazione di uno stress ischemico di differente durata (45' e 60' minuti), la procedura è stato molto più semplice; le manovre chirurgiche effettuate sull'ilo epatico sono state solo di dissezione vascolare e clampaggio selettivo venendo così meno la difficoltà di confezionare un shunt vascolare.

Il gruppo sottoposto a 60 minuti di stress ischemico è stato però caratterizzato da una mortalità che insorge precocemente in un tempo medio di 160 minuti con range compreso tra i 115 e 190 minuti. Questo dato rappresenta un limite importante per il nostro scopo in quanto procedere al ELTaux comporta dei tempi tecnici operatori che possono superare quelli medi di sopravvivenza della cavia dall'instaurarsi della IEA. Allo stesso tempo possiamo dire che l'utilizzo di questo modello può essere riservato ad altri protocolli sperimentali per lo studio dell'IEA e delle modifiche bioumorali che essa comporta.

Tra le altre osservazioni secondo noi degne di nota segnaliamo:

- Il gruppo di controllo in cui si è effettuata una devascolarizzazione selettiva ad eccezione del lobo PD è stata

caratterizzata da una sopravvivenza a 7 giorni del 100%, e dal riscontro, al momento del sacrificio, di una ipertrofia compensatoria dello stesso lobo PD.

- Negli animali dei diversi gruppi sono state osservate diverse varianti anatomiche del ramo arterioso per il lobo PD; in 19 casi abbiamo identificato un ramo per il lobo PD ad emergenza dall'arteria epatica Dx ed in 5 casi dal tronco epatico comune; in 3 casi abbiamo osservato la presenza di due diverse arterie per il lobo PD, una ad insorgenza dall'arteria epatica comune e l'altra dall'arteria epatica Dx (Fig 12,13).

- nella revisione della letteratura da noi effettuato non abbiamo riscontrato la descrizione di questa peculiarità anatomica nel maiale da noi osservata.

CONCLUSIONI

Una approfondita conoscenza dell'anatomia vascolare epatica del maiale ci ha consentito di identificare un lobo con il suo ramo portale ed arterioso disseccabile e ne ha permesso la preservazione ed il successivo clampaggio nella devascolarizzazione epatica senza la necessità di eseguire uno shunt PC.

L'analisi dei risultati ottenuti nel modello in cui è stato effettuato uno stress ischemico del lobo PD della durata di 45 minuti quali una mortalità del 100% in un tempo medio di 490 minuti con range compreso tra 410 e 550 min ed una scarsa manipolazione del campo operatorio, ne fanno un modello adeguato da applicare nello studio della rigenerazione epatica, dell'ELTaux, dei sistemi di supporto epatico ad oggi disponibili (BAL, MARS) e nella validazione di nuove metodologie di approccio clinico e terapeutico della IEA nell'uomo quali la arterializzazione del flusso portale; Inoltre bisogna ricordare che tale modello sperimentale risulta estremamente versatile per il suo grado di IEA modificabile in base al tempo di clampaggio applicato.

ICONOGRAFIA

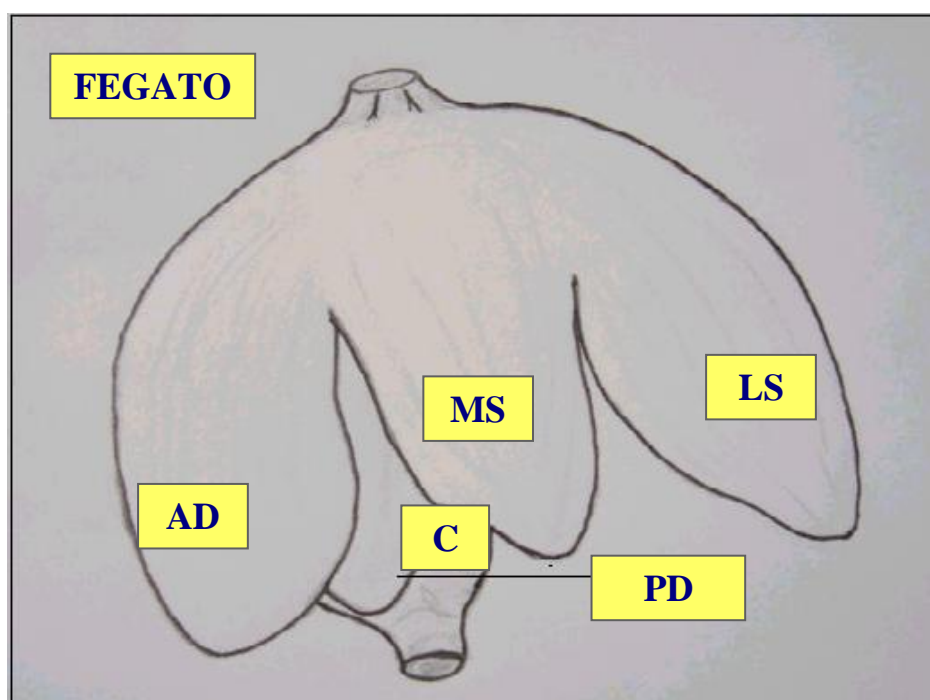
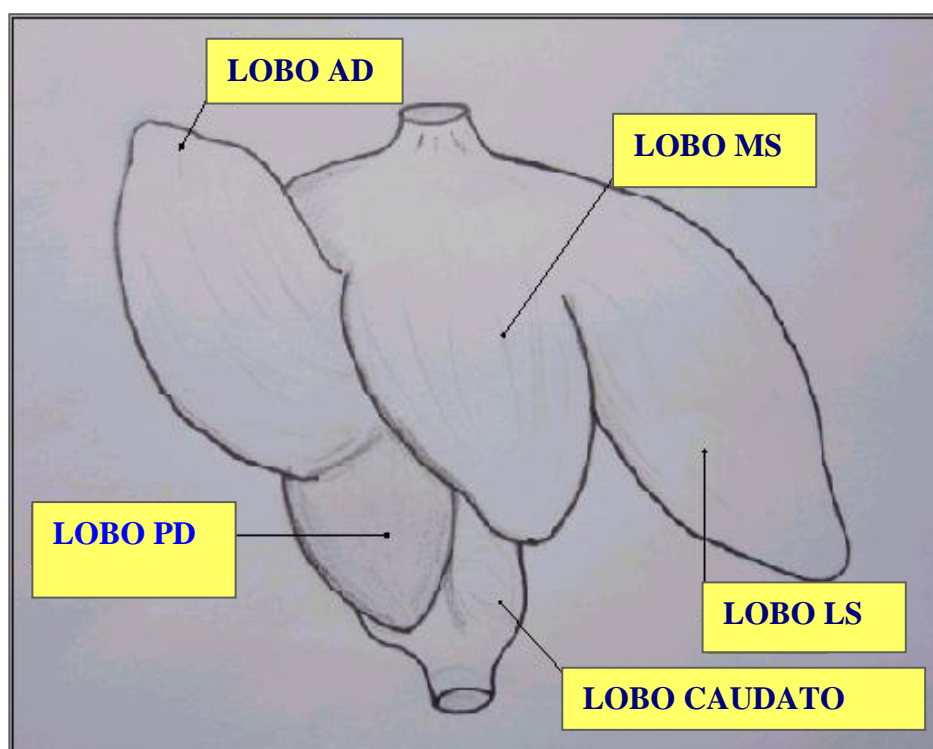


Fig.1 e 2: anatomia del fegato del maiale



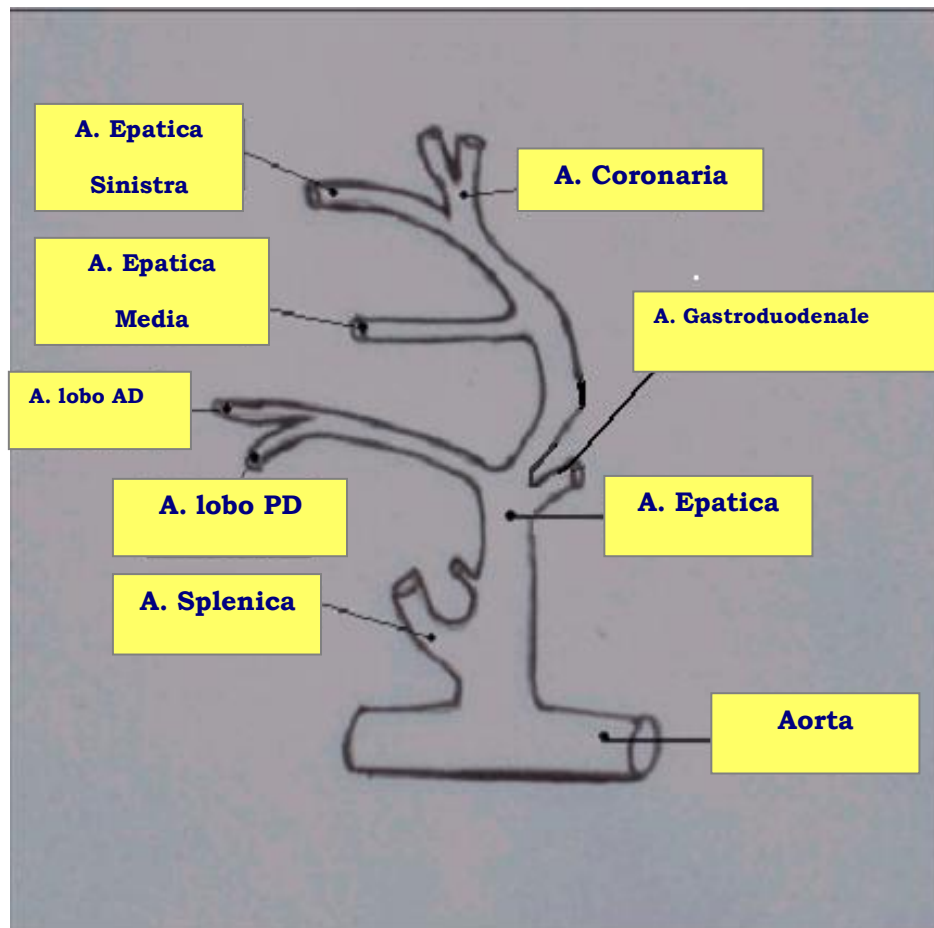
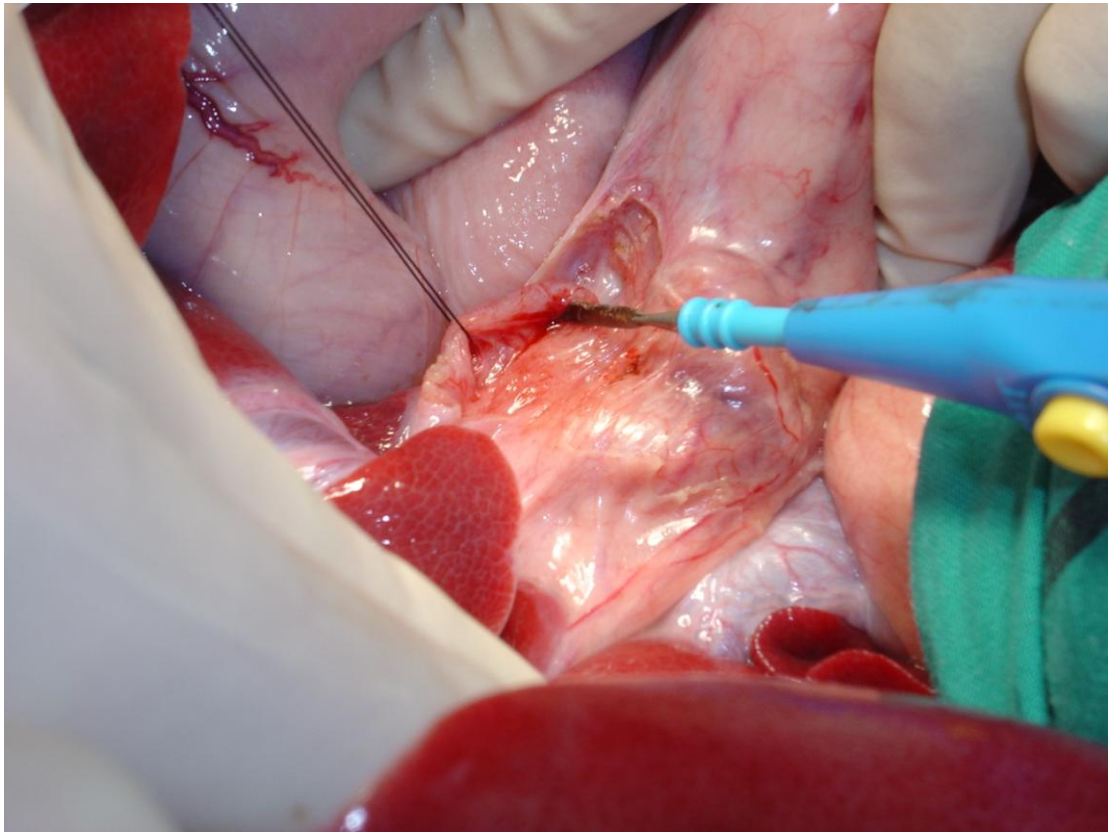
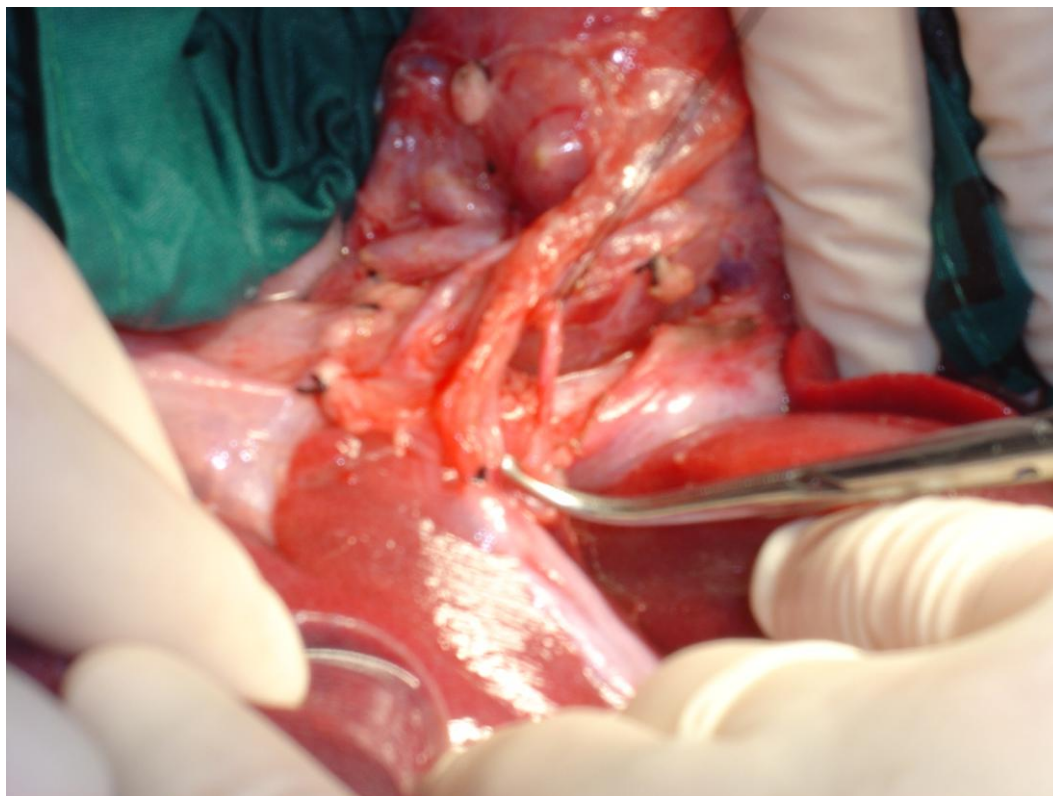


Fig. 3: Anatomia delle ramificazione arteriosa



*Fig. 4: Devascolarizzazione arteriosa:
arteria epatica sinistra*



*Fig. 5: Devascolarizzazione arteriosa:
arteria epatica media e destra*

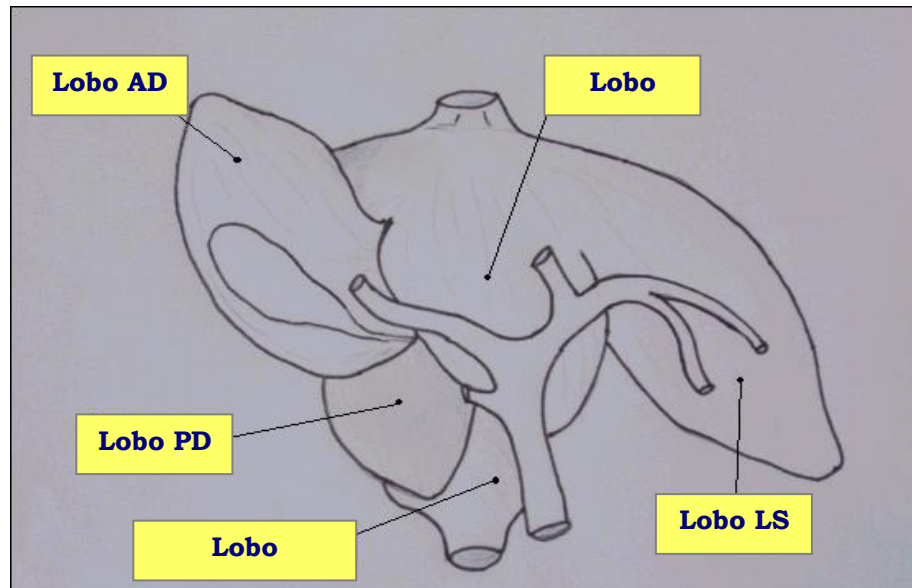
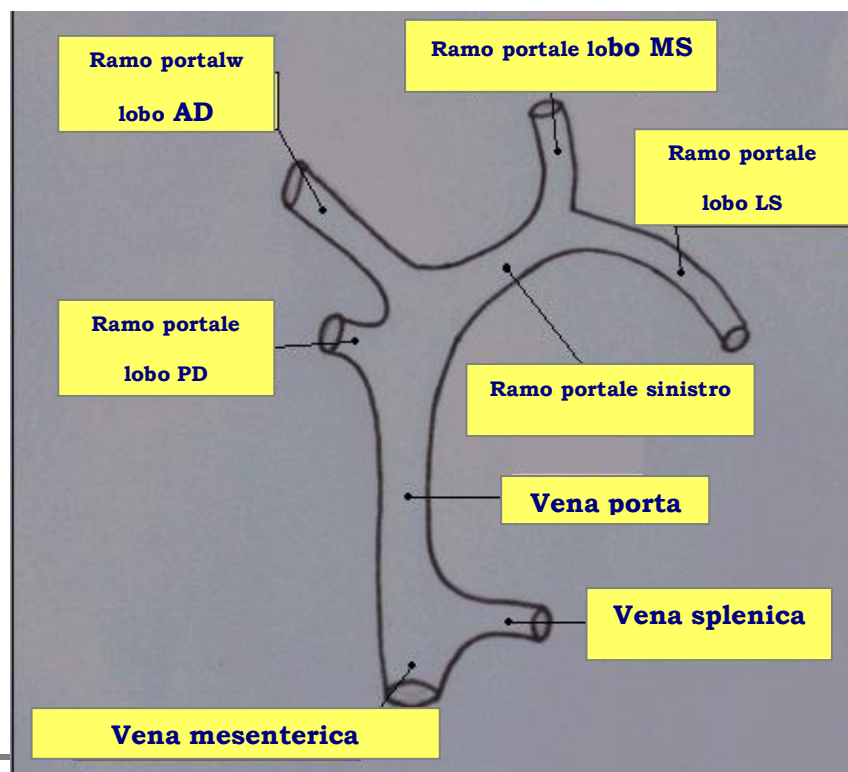


Fig. 6 e 7: Anatomia delle ramificazioni portalì



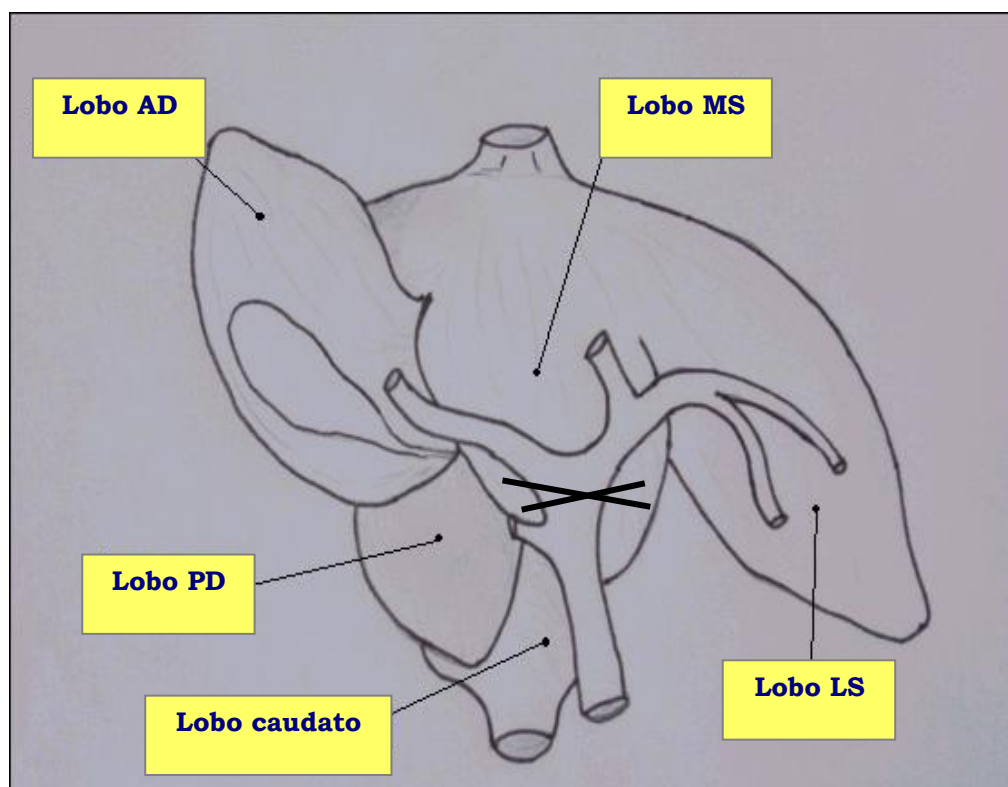


Fig. 8: Legatura portale

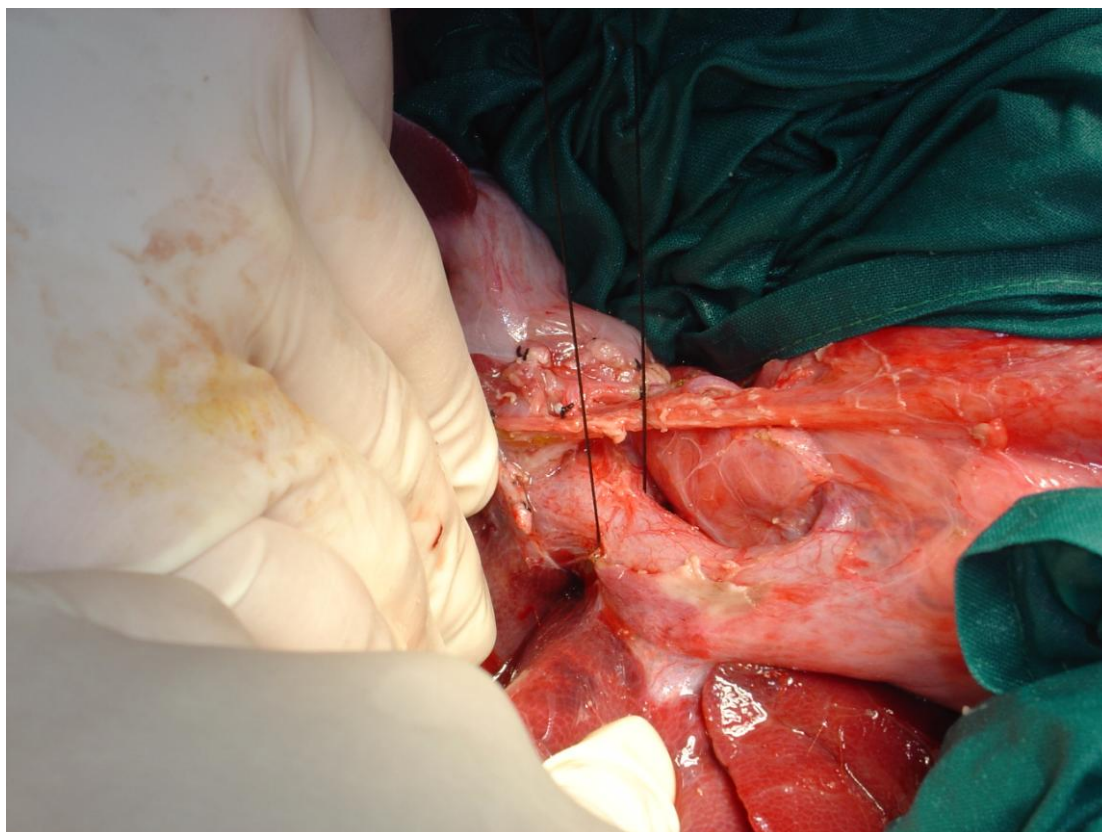


Fig. 9: Legatura portale

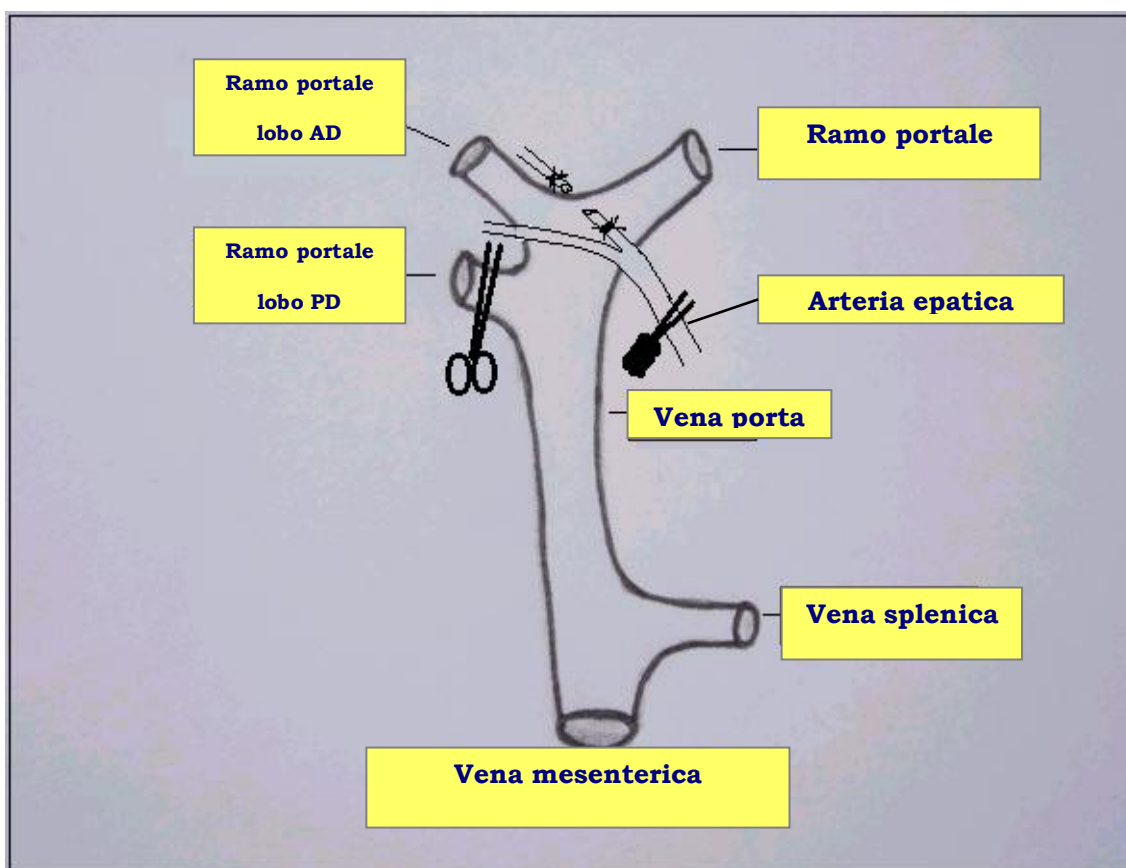


Fig. 10: Clampaggio selettivo ramo portale PD, legatura arteria epatica sinistra, clampaggio arteria epatica destra

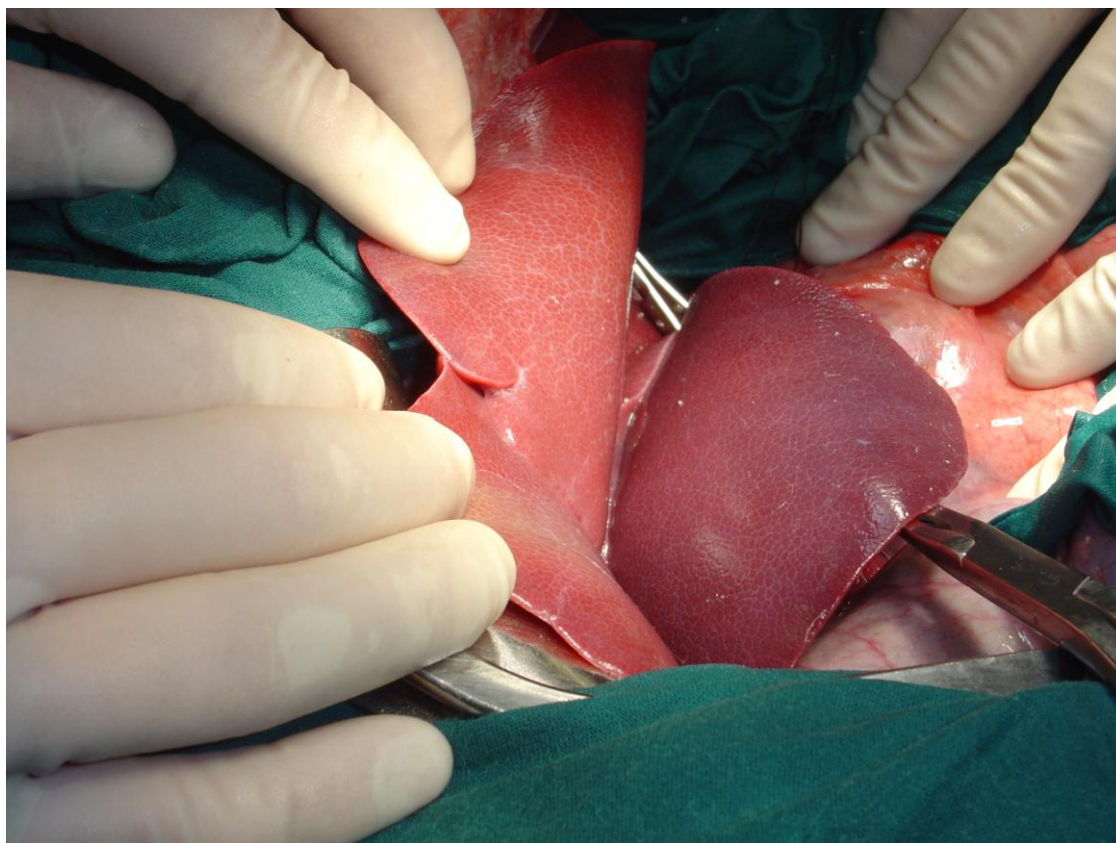


Fig. 11: Clampaggio selettivo ramo portale PD, legatura arteria epatica sinistra, clampaggio arteria epatica destra

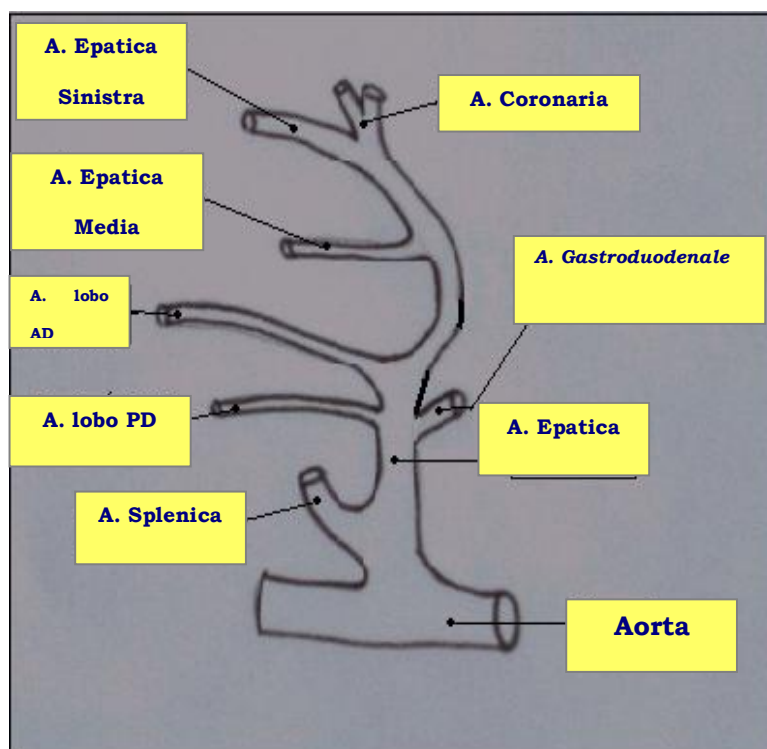
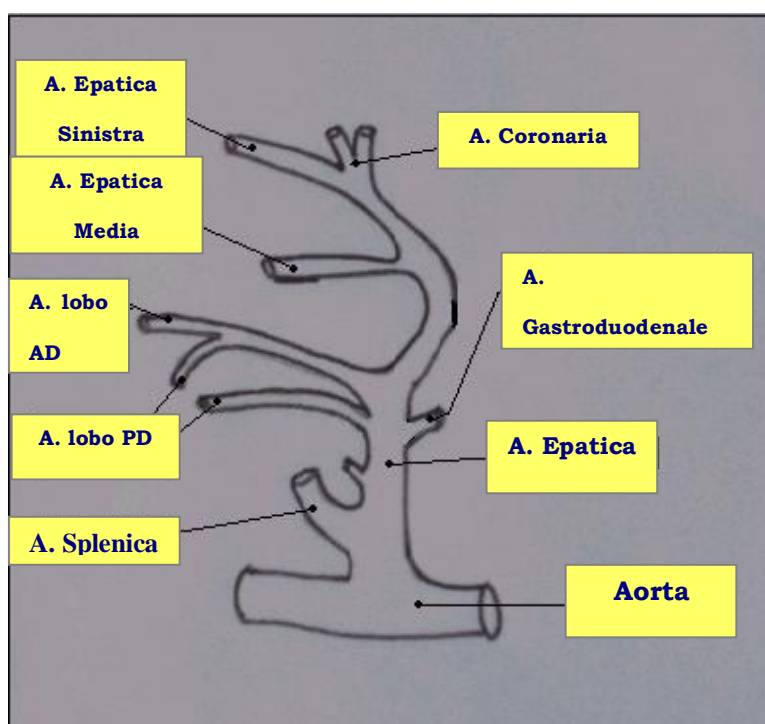


Fig. 12 e 13: Varianti anatomiche emergenza arteria epatica lobo PD



BIBLIOGRAFIA

1. Lee W.M. Acute liver failure. Am.J.Med. 96:3S-9S, 1994
2. Williams R., Wendon J. Indications for orthotopic liver trasplantation in fulminant liver failure. Hepatology 20: S5-S10, 1994
3. Devlin J., Wendon J. Pretrasplantation clinical status and outcome of emergency trasplantation for acute liver failure. Hepatology 21:1018-1024, 1995
4. Bihari D., Alexander E.S. Cardiovascular, Pulmonary and Renal complications of FHF. Seminars in liver disease 6:2, 1986
5. Bihari D. Acute liver failure. Clin Anaesthesiol 3:973-997,1985
6. Clarke G. Multiple system organ failure. Clin Anaesthesiol 3:1027-1053,1985
7. Knaus W., Draper E.. Prognosis from combined organ failure: A national study. Crit Care Med 12:239,1984
8. Ritt D., Wehelan G. et al. Acute Hepatic necrosis with stupor and coma. An analysis of 31 patient. Medicine 48:151-172, 1969
9. Rueff B., Benhamou J. Acute hepatic necrosis and fulminant hepatic failure. Gut 14:805-815,1973
10. Trewby P.,Williams R. Pathophysiology of hypotension in patients with fulminant hepatic failure. Gut 18:1021-1026, 1977
11. Trewby P., Warren R. et al. The incidence and pathophysiology of pulmonary edema in fulminant hepatic failure. Gastroenterology 74:859-865, 1978
12. Llopart L., Nuvials X. Insuficiencia hepàtica aguda grave. Trasplante Hepatico y Cirugia HBP 105-19, 2000

13. Bihari D., Gimson A. et al. Tissue hypoxia in fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 13:1034-39, 1985
14. Nagashima I., Leigh Bergmann et al. Auxiliary Heterotopic Partial Liver Trasplantation in pigs with Acute Ischemic Liver Failure. *Hepat Gastroent* 44:1426-31, 1997
15. Terblanche J., Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 36:770-74, 1991
16. Manibur Rahman T., Humphrey J.F. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Path* 81:145-57, 2000
17. Kahn D., Hickman R. et al. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs- the response to different resection sizes. *J Surg Res* 45:176-80, 1988
18. Wang X.D., Ar'rajab A. et al. The influence of surgically induced acute liver failur on the intestine in the rat. *Scand J Gastroenterol* 28:31-40, 1993
19. Panis Y., McMullan D.M. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 121:142-49,1997
20. Kawasaki T., Moriyasu F. Portal hemodynamic changes from partial hepatectomy- Quantitative analysis of portal flow before, during and after hepatectomy, using an Doppler Ultrasound System. *Nippon Shokakibyō* 87:979-88, 1990
21. Kawasaki T., Moriyasu F. et al. Changes in portal blood flow consequent to partial hepatectomy: Doppler estimation. *Radiology* 180:373-77, 1991
22. Kahn D., Van Hoorn Hickman R. Liver blood flow after partial hepatectomy in the pig. *J Surg Res* 37:290-94, 1984

23. Wang X., Andersson R. et al. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. Arch Surg 127:1101-06,1992
24. Joyeux H., Joyeux A., et al. Hepatic assistance after subtotal or total hepatectomy in the dog: a new concept. Trans Am Soc Artif Intern Organs 23:683-90, 1977
25. Fick T.E., Scham S.V. A surgical model of fulminant hepatic failure in the rabbits: different effects of end-to-side Vs small-diameter side-to-side portacaval shunt. Eur Surg Res 19:276-82, 1987
26. Kahn D., Hickman R. A porcine model for the study of liver regeneration. J Invest Surg 1:139-42, 1988
27. Losser M.R., Payen D. Mechanisms of liver damage. Semin Liver Dis 16:357-67, 1996
28. Rozga J., Podesta L. et al. Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure. Lancet 342:898-99, 1993
29. Ejlersen E., Larsen F.S. Hepatectomy corrects cerebral hyperperfusion in fulminant hepatic failure. Transplant Proc 26:1794-95, 1994
30. Theodoraki K., Kostopanagiotou G. Haemodynamic changes in ischaemic vs anhepatic pig experimental model of acute liver failure. Eur J of Anaesth 19:40-46, 2002
31. Tonessen K. Experimental liver failure a comparison between hepatectomy and hepatic devascularization in the pig. Acta Chir Scand 143:271-77, 1977
32. Terblanche J. Animals models of fulminant hepatic failure. Dig Dis and Sciences 36:770-74: 1991

33. Fischer M., Stotter L. et al. Acute liver failure due to temporary hepatic ischemia in the pig. *Acta Hepatogastroenterol Stuttg* 23:241-49, 1976
34. Tonnesen K. Total devascularization of the liver: an experimental model of acute liver failure. *Scand J Gastroenterol Supplement* 37:27-31, 1976
35. De Groot G.H., Reuvers C.B. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res* 42:92-100, 1987
36. Ytrebo L.M., Revhaug A. An experimental large animal model for the assessment of Bioartificial Liver Support Systems in fulminant hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 9:1077-88, 2002
37. Takahashi N., Ishizuya T., et al. In-vitro preparation of experimental models of hepatitis with D-galactosamine and their modification by liver repairing factors. *Int J Tissue React* 12:263-68, 1990
38. Leist M., Gantner F. The 55-KD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol Med* 2:109-124, 1996
39. Diaz Buxo J.A., Blumenthal S. et al. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 25:950-57, 1997
40. Blitzer B.L., Waggoner J.G. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 74:664-71, 1978
41. Makin A.J., Williams R. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: predisposing factors and treatments. *Adv Intern Med* 42:453-483, 1997

42. Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 78:382-92, 1980
43. Gregus Z., Madhu C. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 91-99, 1988
44. Green C.E., Dabbs J.E. Metabolism and cytotoxicity of acetaminophen in hepatocytes isolated from resistant and susceptible species. *Toxicol Appl Pharmacol* 76:139-149, 1984
45. Eguia L., Materson B.J. Acetaminophen related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* 17:363-70, 1997
46. Baudouin S.V., Howdle P. Acute lung injury in fulminant hepatic failure following paracetamol poisoning. *Thorax* 50:399-402, 1995
47. Shi Z., Wakil A.E. Strain specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10663-10668, 1997
48. Dashti H., Jeppsson B. et al. Thioacetamide and CCl₄ induced liver cirrhosis *Eur Surg Res* 21:83-91, 1989
49. Chieli E., Malvaldi G. Role of the microsomal FAD containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 31:41-52, 1984
50. Mizuhara H., Kuno M. Strain difference in the induction of T-cell activation-associated interferon gamma dependent hepatic injury in mice. *Hepatology* 27:513-19, 1998
51. Van Bossuyt H., Wisse E. Endotoxin injection affects the Kupffer cell morphology in the rat liver. *Prog Clin Biol Res* 272:161-171, 1988

52. Van Bossuyt H., Wisse E. Structural changes produced in Kupffer cell in the rat liver by injection of LPS. *Cell Tissue Res* 251:205-214, 1988
53. Nolan J.P. Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury an idea whose time has come again. *Hepatology* 10:887-891, 1989
54. Takada Y., Ishiguro S. Increased intracranial pressure in a porcine model of fulminant hepatic failure using amatoxin and endotoxin. *J of Hepatology* 34:825-831, 2001.

INDICE

| | |
|-------------------------------------|--------|
| • INTRODUZIONE | pag. 2 |
| • MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLA IEA | „ 3 |
| REQUISITI PER UN MODELLO ANIMALE | „ 5 |
| • MODELLI SPERIMENTALI | „ 7 |
| -MODELLI CHIRURGICI | „ 7 |
| -MODELLI FARMACOLOGICI | „ 10 |
| • MODELLO SPERIMENTALE PERSONALE | „ 12 |
| -MATERIALE E METODI | „ 13 |
| -RISULTATI | „ 19 |
| -DISCUSSIONE | „ 27 |
| -CONCLUSIONI | „ 32 |
| • ICONOGRAFIA | „ 33 |
| • BIBLIOGRAFIA | „ 44 |